



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>A61K 35/74, A23L 1/03, 1/308, A23C 19/032</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 98/27991</b> <b>(43) Date de publication internationale: 2 juillet 1998 (02.07.98)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR97/02399 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 23 décembre 1997 (23.12.97) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 96/15977 24 décembre 1996 (24.12.96) FR 97/00885 28 janvier 1997 (28.01.97) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> LABORATOIRES STANDA S.A. [FR/FR]; 68, rue Robert Kaskoreff, F-14050 Caen Cedex (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> ROUSSEL, Edmond, Daniel [FR/FR]; 16, rue St. Loup, F-14210 Avenay (FR). LEGRAND, Charles, Gabriel [FR/FR]; Les Ombrages N°3, 14, avenue de Creully, F-14000 Caen (FR). LEGRAND, Marc, Henri [FR/FR]; 6, allée Beauséjour, Le Vendome, F-14000 Caen (FR). ROLAND, Nathalie [FR/FR]; Bâtiment A, 62, rue Papu, F-35000 Rennes (FR). <b>(74) Mandataire:</b> CABINET HERRBURGER; 115, boulevard Haussmann, F-75008 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
<b>(54) Title:</b> ABSORBABLE COMPOSITION CONTAINING PROPIONIC BACTERIA CAPABLE OF RELEASING NITRIC OXIDE IN THE HUMAN OR ANIMAL ALIMENTARY CANAL <b>(54) Titre:</b> COMPOSITION ABSORBABLE RENFERMANT DES BACTERIES PROPIONIQUES SUSCEPTIBLE DE DEGAGER DU MONOXYDE D'AZOTE DANS LE TUBE DIGESTIF HUMAIN OU ANIMAL <b>(57) Abstract</b> The invention concerns the use of propionic bacteria for obtaining a current feeding composition or an absorbable dietetic or medicinal composition capable of releasing physiologically significant amounts of nitric oxide in the human or animal alimentary canal. <b>(57) Abrégé</b> Utilisation de bactéries propioniques pour l'obtention d'une composition d'alimentation courante ou d'une composition diététique ou médicamenteuse absorbable susceptible de dégager des quantités physiologiquement significatives de monoxyde d'azote dans le tube digestif humain ou animal.		

# UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce		de Macédoine	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun			PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

« Composition absorbable renfermant des bactéries propioniques susceptible de dégager du monoxyde d'azote dans le tube digestif humain ou animal »

La présente invention concerne une composition d'alimentation courante ou une composition diététique ou médicamenteuse absorbable renfermant des bactéries propioniques susceptibles de dégager des quantités physiologiquement significatives de monoxyde d'azote dans le tube digestif humain ou animal.

Pendant de nombreuses décennies, on a totalement ignoré que le monoxyde d'azote constitue l'un des éléments nécessaires à la vie et à son maintien ; par suite jusqu'à ces quatre ou cinq dernières années, les chercheurs ne se sont pas penchés sur les bienfaits associés à la présence de cet oxyde, que ce soit en médecine, en nutrition ou en physiologie.

Ce n'est que tout dernièrement que l'on a attribué au monoxyde d'azote un nombre impressionnant de fonctions physiologiques et que l'on a émis l'hypothèse que ce gaz pouvait être impliqué au premier chef dans des fonctions aussi diverses que le contrôle de la pression artérielle, la fonction cytotoxique non spécifique des macrophages, l'agrégation plaquettaire et la neurotransmission ou encore le contrôle de la motricité du tube digestif.

A partir de cette supposition, les recherches portant sur le monoxyde d'azote se sont multipliées et l'importance de ce gaz a pu être confirmée.

Il est connu que le monoxyde d'azote, qui est un gaz très instable (demi-vie inférieure à 5 secondes dans les systèmes biologiques), est produit par biosynthèse au sein de l'organisme humain ou animal à partir de la L-arginine par un groupe d'enzymes dénommées NO-synthases (NOS) dont il existe deux types principaux, à savoir d'une part les NOS constitutives qui sont exprimées notamment dans les cellules endothéliales, les plaquettes sanguines et les neurones et, d'autre part, les NOS inductibles qui sont exprimées principalement par certaines cellules du système immunitaire (macrophages et

polynucléaires notamment) par le muscle lisse vasculaire et les cellules endothéliales.

Il est à noter que la production de NO par les NOS inductibles est, de plusieurs ordres de grandeurs, supérieure à la production de NO par les NOS constitutives, mais  
5 que dans tous les cas, cette production demeure relativement faible.

Or, et compte tenu du rôle bénéfique susmentionné du monoxyde d'azote, il serait souhaitable de pouvoir augmenter cette production en particulier en utilisant la voie naturelle du métabolisme alimentaire.  
10

On n'a cependant jusqu'à présent jamais proposé de moyens permettant de parvenir à ce résultat.

L'objet de l'invention est de combler cette lacune.  
15

Conformément à l'invention, on a pu parvenir au but recherché en constatant que, de manière surprenante, un type particulier de bactéries, les bactéries propioniques, sont susceptibles de produire du monoxyde d'azote, et que  
20 parmi ces bactéries, certaines espèces et certaines souches parmi ces espèces en produisent de grandes quantités.

Il s'agit là de bactéries propioniques qui, bien que n'appartenant pas au groupe des bactéries lactiques ou bifidobactéries classiquement introduites dans l'organisme  
25 par le biais de desserts lactés ou autres produits laitiers fermentés, sont néanmoins présentes en alimentation humaine depuis des siècles : ce sont en effet elles qui permettent l'obtention des trous lors de la fabrication du fromage dénommé « emmental » qui en fin d'affinage renferme environ  
30  $10^9$  cellules/g de bactéries propioniques.

Il est à noter que la fermentation de ces bactéries produit entre autre de l'acide propionique, de l'acide acétique et du dioxyde de carbone.

La constatation susmentionnée est d'autant plus  
35 surprenante que l'on a pu vérifier que des bactéries lactiques, des bifidobactéries et/ou des levures, utilisées couramment dans le domaine agro-alimentaire, ne produisent pas de monoxyde d'azote.

L'invention se rapporte, en conséquence, à l'utilisation de bactéries propioniques pour l'obtention d'une composition d'alimentation courante ou d'une composition diététique ou médicamenteuse absorbable susceptible de  
5 dégager des quantités physiologiquement significatives de monoxyde d'azote dans le tube digestif humain ou animal.

Conformément à l'invention, cette composition peut être constituée par une préparation élaborée et/ou présentée sous forme liquide (en particulier d'un liquide fermenté), sous forme déshydratée ou d'humidité intermédiaire.  
10

Plus précisément, il est à noter que, sans pour cela sortir du cadre de l'invention, la composition peut se présenter :

- soit sous forme d'une préparation spécifique se justifiant  
15 par sa seule finalité physiologique, à savoir l'ingestion de bactéries propioniques susceptibles de dégager des quantités physiologiquement significatives de monoxyde d'azote,
- soit sous forme d'une préparation alimentaire élaborée ayant parallèlement une finalité autre plus strictement  
20 énergétique ou fonctionnelle ; dans ce dernier cas, les bactéries propioniques peuvent être ajoutées ou incorporées dans les aliments eux-mêmes notamment dans des fromages, dans des fibres alimentaires telles que des flocons de céréales, ou encore dans des laits fermentés, crèmes des-  
25 serts, gâteaux et/ou boissons bienfaisantes, etc..

Conformément à l'invention, les bactéries propioniques peuvent être introduites sous forme de biomasse ou sous la forme d'un levain susceptible de se multiplier in situ.

Lorsqu'elle est déshydratée, la composition se présente, avantageusement, sous forme de fractions individuelles renfermant la dose de bactéries devant être absorbée régulièrement.  
30

Ces fractions peuvent être ingérées directement  
35 ou être préalablement diluées dans un liquide ; elles peuvent être conditionnées sous une forme permettant de faciliter l'absorption : comprimés, sachets de poudre granulée, liquide, ...

On a vérifié que de telles préparations déshydratées concentrées de bactéries propioniques conservées une année à +4°C voient leur concentration baisser de moins de un Log.

5 L'expérience a prouvé que des gélules gastrorésistantes ou non correspondent à un type de conditionnement particulièrement avantageux.

Selon une autre caractéristique de l'invention, chaque fraction individuelle renferme un grand nombre de bac-  
10 téries, de préférence plus de  $10^9$  bactéries.

Diverses expérimentations (résumées ci-dessous) ont permis de vérifier l'aptitude toute particulière de différentes souches de bactéries propioniques à produire du NO au cours de leur culture, d'abord indirectement à partir de  
15 la mesure des ions nitrites  $\text{NO}_2$  puis directement par analyse en spectrométrie de masse en milieu anaérobie.

Au cours de ces expérimentation, on a, dans un premier temps, étudié la concentration en nitrites dans des milieux riches en arginine et pauvres en nitrates ( $50 \mu\text{M}$ ) et  
20 on s'est rendu compte que l'arginine n'est pas un élément déterminant dans la production de NO observée.

Dans un second temps, on a expérimenté des milieux supplémentés en nitrates. Les résultats obtenus dans ce dernier cas ont révélé le caractère nitrate dépendant de la  
25 production de monoxyde d'azote.

#### 1 - Essais préliminaires comparatifs

Différentes souches bactériennes (inoculum yaourt, bifidobactéries, lactobacillus) ont été cultivées  
30 en présence d'un milieu lait reconstitué (100 ml) supplémenté par un extrait de levures (10 g/l) puis incubées à 37°C.

L'accumulation de nitrite a été mesurée au cours du temps.

35 Ces essais préliminaires ont été réalisés dans les conditions suivantes :

- incubation à 37°C pendant 0, 4, 7 ou 10 heures,
- 3 répétitions,

- dosage des nitrites par système Bran-Luebbe.

En raison de la nature des extraits à analyser, une étape de purification des échantillons a été successivement mise en oeuvre par une double centrifugation (2 x 10 min., 4°C, 15 000 rpm), suivie d'une ultrafiltration sur cartouche miniprep 10 (rétention des protéines de PM > 10kD) puis d'une purification partielle par passage de l'échantillon sur résine Waters C18 (55-105 µm).

Cette méthode a, dans un premier temps, été testée sur des échantillons étalons de nitrite (Figure 1), puis sur des extraits de culture de *Lactobacillus* incubés 7 heures auxquels a été ajoutée ou non une quantité connue de nitrite (Figure 2).

La figure 1 représente les profils colorimétriques obtenus sur une chaîne d'analyse automatique Bran Luebbe :

- (1) d'un milieu de culture de bifidobactéries après 10 heures d'incubation,
- (2) d'une solution standard de nitrite,
- (3) de cette même solution ultrafiltrée,
- (4) de cette même solution ultrafiltrée et passée sur résine C18.

La figure 2 représente les profils colorimétriques obtenus sur une chaîne d'analyse automatique Bran Luebbe :

- (1) d'un milieu de culture de *Lactobacillus* après 10 heures d'incubation à 37°C,
- (2) (3) d'une solution standard contenant 410 µg de nitrite/l,
- (4) (5) d'un milieu de culture de *Lactobacillus* après 10 heures d'incubation à 37°C auxquels a été ajoutée une quantité connue de nitrite afin d'obtenir une solution à 820 µg/l de nitrite.

Ces échantillons ont été purifiés par centrifugation ultrafiltration et passage sur résine C18 dans les conditions décrites précédemment.

Conformément à ces essais, aucune accumulation de nitrite n'a pu être détectée que ce soit à partir

d'inoculum de yaourt, de bifidobactéries ou de *Lactobacillus*, ce quel que soit le temps d'incubation (0, 4, 7 ou 10 heures).

5    2 - Mise en évidence de l'accumulation de nitrite par des cultures de bactéries propioniques

On a préalablement recherché la présence éventuelle de nitrate ou de nitrite dans la préparation du milieu YEL par dosage colorimétrique (kit Boehringer) :  
10    on a ainsi pu mettre en évidence la présence d'une quantité non négligeable de nitrate dans ce milieu (concentration de l'ordre de 50 à 100  $\mu\text{M}$ ) qui pourrait provenir de l'extrait de levure utilisé pour la fabrication de ce milieu ; en revanche, on a vérifié que le milieu YEL était totalement exempt de nitrite.  
15

Des cultures de bactéries propioniques (1 g de lyophilisat pour 100 ml de milieu YEL) ont été testées.

Ces essais ont été mis en oeuvre dans les conditions suivantes :

- 20    • incubation à 30°C pendant 24, 48 ou 72 heures,  
     • 3 répétitions pour l'incubation de 24 heures,  
     • arrêt de l'incubation par ébullition,  
     • purification du produit par centrifugation et passage de l'extrait sur résine C18,  
25    • dosage des nitrites dans le milieu par analyse sur système Bran-Luebbe.

On a dosé les nitrites accumulés par les bactéries propioniques afin d'établir une cinétique d'accumulation des nitrites en fonction du temps d'incubation des bactéries sur milieu YEL.  
30

La figure 3 représente, d'une part, les variations de la quantité de nitrite produite (en  $\mu\text{g}/100$  ml de culture) en fonction du temps d'incubation (en heures) ( $\square$ ) et d'autre part les variations de la turbidité (absorbance à  $\lambda = 650$  nm) également en fonction du temps d'incubation (O).  
35



Cette figure montre que la quantité de nitrite est maximale à 24 heures puis diminue ensuite de façon significative après 48 et 72 heures d'incubation.

On peut raisonnablement penser que cette chute  
5 résulte de la réduction du nitrite en NO, N<sub>2</sub>O ou autres composés par la nitrite réductase.

Conformément à l'invention, on a pu prouver que l'accumulation de NO<sub>2</sub> dépend des espèces ou souches de bactéries propioniques mises en oeuvre.

10 Cette situation a été vérifiée par les essais résumés ci-dessous :

3 - Mise en évidence et comparaison des accumulations de nitrite dans le milieu de culture dans le cas de 9 souches  
15 de 4 espèces différentes de bactéries propioniques

Conformément à cet essai, on a étudié les souches P20, P23, 2408, 2410, 2500 et 2501 de l'espèce *P.freudenreichii* et les souches TL221, TL223 et TL207 appartenant respectivement aux espèces *P.thoenii*,  
20 *P.acidipropionici* et *P.jensenii*.

Il est à noter que les souches TL (technologie laitière) sont des souches appartenant à l'INRA-LRTL, tandis que la souche P23 (ou ITG23) a été enregistrée à la Collection Nationale des Cultures de Micro-organismes  
25 (CNCM) de l'Institut Pasteur sous le numéro I-1804 en date du 18.12.96.

Les différentes souches de bactéries propioniques (1 g de lyophilisat ou 5 ml de culture fraîche) ont été cultivées sur 100 ml de milieu YEL contenant environ  
30 50 µM de nitrate, selon les conditions suivantes :

- incubation à 30°C pendant 12, 24, 36 ou 48 heures,
- 3 répétitions,
- arrêt de l'incubation par ébullition,
- purification du produit par centrifugation et passage  
35 de l'extrait sur résine C18,
- accumulation de nitrite dans le milieu, mesurée par analyse sur système Bran-Luebbe,

- estimation de la fermentation de chaque culture mesurée par lecture de l'absorbance à 650 nm.

Les résultats obtenus pour chaque souche sont rassemblés sur la figure 4.

5 Celle-ci représente, dans chaque cas, les variations de l'accumulation de nitrite ( $\square$ ) et de la turbidité du milieu de culture (O) en fonction de la durée d'incubation. Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  l'écart type de la moyenne pour  $n = 3$ .

10 Il convient de noter que les échelles d'accumulation du nitrite sont 25 fois plus grandes dans le cas des souches P23 et TL223.

Ces résultats prouvent que la croissance bactérienne, estimée d'après l'évolution de la turbidité du milieu de culture, est proche pour l'ensemble des souches étudiées, atteignant environ 2 à 2,5 DO après 48 heures d'incubation, à l'exception de la souche TL221 pour laquelle la turbidité n'atteint que 0,6 DO après 2 jours.

15 En revanche, il existe des différences hautement significatives quant à l'accumulation de nitrite en fonction du temps.

20 En effet, les souches 2500, 2408, P20, 2501, 2410, TL207 et TL221 accumulent une quantité relativement peu importante de nitrite, le maximum ( $0,1 \mu\text{g}$  de  $\text{NO}_2^-/\text{ml}$ ) étant atteint respectivement après 36, 12, 36, 12, 12, 24 et 24 heures d'incubation.

30 A l'opposé, une accumulation beaucoup plus forte de nitrite a été obtenue avec des souches P23 et TL223 qui accumulent, au maximum,  $1,8 \mu\text{g}$  de  $\text{NO}_2^-/\text{ml}$  après, respectivement, 36 et 24 heures d'incubation.

Il est à noter que la souche de bactéries propioniques analysée dans le second essai susmentionné (figure 3) avait une position intermédiaire avec une accumulation maximale de  $\text{NO}_2^-$ , d'environ  $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ .

35 Ces essais ont donc permis de constater qu'il existe des différences significatives entre les quantités de nitrite pouvant être produites par différentes souches de bactéries propioniques de quatre espèces différentes,

ces différences étant indépendantes de la croissance de ces souches.

Ces résultats ont pu être confirmés par l'étude pour chaque souche de l'évolution de la concentration en nitrite du milieu de culture en fonction de sa turbidité et donc approximativement de la croissance bactérienne.

Les résultats de ces derniers essais sont rapportés sur la figure 5 sur laquelle chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  l'écart type de la moyenne pour  $n = 3$ .

Les essais susmentionnés ont été de nature à établir que, parmi les souches étudiées, la souche TL223 est la plus fortement accumulatrice de nitrites, ces nitrites disparaissant après 12 heures. Cette souche a donc été retenue dans le cadre d'essais complémentaires portant sur la mesure directe de la production de monoxyde d'azote par analyse en spectrométrie de masse en milieu anaérobie.

#### 4 - Mesure préliminaire de la production de NO par la souche TL223 sous atmosphère d'hélium

Conformément à ces essais, les cultures ont été réalisées dans des tubes de 10 ml contenant 5 ml de milieu YEL contenant environ 50  $\mu$ M de nitrate et 0,25 ml de culture fraîche de la souche TL223.

L'atmosphère des tubes a été immédiatement évacuée par un flux d'hélium (100 ml/min.) pendant 100 secondes.

L'accumulation de NO dans l'atmosphère des tubes a ensuite été mesurée au cours du temps dans les conditions suivantes :

- incubation à 30°C pendant 24, 48 ou 72 heures,
- 4 répétitions,
- mesure de l'accumulation de NO par analyse en spectrométrie de masse,
- estimation de la fermentation de chaque culture mesurée par lecture de l'absorbance à 650 nm.

Lors d'un essai préliminaire, le système de purification de gaz (Roboprep G+) - spectromètre de masse

(Twenty-Twenty) a été calibré par des quantités croissantes de monoxyde d'azote.

Ce gaz a été généré à partir de  $\text{NaNO}_2$  en présence d'une solution de KI et  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

5 L'identification et la quantification du monoxyde d'azote ont été réalisées par sa masse : 30 pour  $^{14}_{\text{N}}^{16}_{\text{O}}$  et 31 pour  $^{15}_{\text{N}}^{16}_{\text{O}}$  et  $^{14}_{\text{N}}^{17}_{\text{O}}$ . Cette identification a ensuite été confirmée par la mesure du rapport isotopique :  $31/30 = [^{15}_{\text{N}}^{16}_{\text{O}} + ^{14}_{\text{N}}^{17}_{\text{O}}] / ^{14}_{\text{N}}^{16}_{\text{O}}$ . Il est à noter que le rapport isotopique théorique 31/30 du NO est de 0,00367 en l'absence de contamination par  $^{17}_{\text{O}}$ .

10 Les résultats de cet essai préliminaire sont rapportés sur la figure 6 sur laquelle la partie gauche (A) correspond à la courbe d'étalonnage du spectromètre de masse utilisé pour la quantification du monoxyde d'azote tandis que la partie droite (B) correspond à la mesure du rapport isotopique 31/30.

15 Les résultats proprement dits de cet essai sont rapportés sur la figure 7.

20 Plus précisément, la figure 7A représente les variations de l'accumulation de NO dans l'atmosphère des tubes en fonction de la turbidité du milieu tandis que la figure 7B représente les variations de cette accumulation en fonction du temps d'incubation.

25 Les barres verticales ou horizontales indiquent, lorsqu'elles sont plus larges que le symbole, l'écart type de la moyenne pour  $n = 4$ .

30 Une comparaison de la figure 7B (qui représente l'évolution au cours du temps de la turbidité du milieu de culture sous hélium) avec la figure 4 (qui représente cette même évolution à l'air) montre que la croissance de la souche TL223 n'est pas affectée significativement par une atmosphère constituée essentiellement d'hélium.

35 On a également pu établir que la vitesse d'accumulation du monoxyde d'azote dans l'atmosphère est constante durant environ les 45 premières heures d'incubation, puis s'infléchit ensuite (figure 7B), ce

qui correspond à une turbidité proche de 1,5 DO (figure 7A).

Après environ 65 heures d'incubation (turbidité supérieure à 1,7 DO), environ 1,5  $\mu\text{g}$  de NO sont accumulés dans l'atmosphère d'hélium pour 1 ml du milieu de culture.

L'ordre de grandeur obtenu est compatible avec les teneurs en nitrite mesurées dans le milieu pour des cultures au contact de l'air.

Dans ce dernier cas, on avait en effet pu constater (figure 5) que la souche TL223 accumulait au maximum 1,8  $\mu\text{g}$  de  $\text{NO}_2^-$ /ml pour une turbidité de 1,5 DO, ce qui correspond à environ 1,2  $\mu\text{g}$  de NO/ml.

A partir de cette mesure directe préliminaire de la production de NO par la souche TL223, on a cherché, conformément à l'invention, à confirmer la voie de synthèse de ce monoxyde d'azote, et on a eu à cet effet l'idée de rechercher si celle-ci est stimulée par un apport de nitrite ou de nitrate.

Une telle stimulation a pu être vérifiée grâce aux essais résumés ci-dessous :

#### 5 - Etude de la stimulation de la production de NO par apport de nitrite ou de nitrate

Dans le but de rechercher si la production de NO par les bactéries propioniques est possible à partir de  $\text{NO}_2^-$  ou de  $\text{NO}_3^-$ , on a recherché si l'on observe une augmentation de la production de NO par la souche TL223 lorsqu'elle est en présence de 1 mM de  $\text{KNO}_2$  ou de  $\text{KNO}_3$  (avec et sans marquage isotopique au  $^{15}\text{N}$ ).

Cette expérimentation a été effectuée dans les conditions suivantes :

- la souche TL223 a étéensemencée à 1 % dans un milieu YEL seul (témoin) ou avec addition de 1 mM de  $\text{KNO}_2$ , de  $\text{KNO}_3$  ou de  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  avec un marquage isotopique à  $^{15}\text{N}$  à 50%),
- incubation à 30°C pendant 24, 48 et 72 heures,

- 3 répétitions par point et par traitement,
- accumulation du NO et détermination du rapport isotopique par spectrométrie de masse,
- estimation de la fermentation de chaque culture (turbidité) mesurée par lecture de l'absorbance à 650 nm,
- dosage du nitrate et du nitrite après récupération des milieux bactériens, centrifugation et mesure par kit Boehringer.

On a également analysé l'accumulation de NO en fonction de la concentration en  $\text{NO}_3^-$  (100, 150, 350, 650 et 1050  $\mu\text{M}$ ) ou en  $\text{NO}_2^-$  (50, 100, 400, 800, 1000  $\mu\text{M}$ ) après une incubation de 72 heures à 30°C (TL223 ensemencée à 1 % dans un milieu YEL).

Les échantillons à analyser ont été distribués dans des tubes d'analyse de NO dont l'atmosphère a été immédiatement évacuée par un flux d'hélium (flush à l'hélium) pendant 150 s afin d'obtenir des conditions anaérobies strictes.

L'effet du flush à l'hélium sur une éventuelle détection de NO par le spectromètre de masse a été testé sur un milieu YEL stérile : ce milieu YEL, préalablement flushé à l'hélium, a été incubé à 30°C pendant 72 heures. Après 0, 24, 48 et 72 heures d'incubation (3 répétitions) on n'a détecté aucune production de NO et les valeurs de turbidité sont restées nulles.

On a ainsi pu vérifier la qualité du flush à l'hélium, l'absence de toute contamination bactérienne et l'absence d'interaction entre le flush à l'hélium et la mesure de NO par spectrométrie de masse.

Les essais susmentionnés ont permis d'obtenir les résultats rapportés sur la figure 8, en ce qui concerne la cinétique d'accumulation du NO en présence de nitrite ou de nitrate.

Plus précisément :

- la figure 8A représente les variations de l'accumulation de NO en fonction du temps,

- la figure 8B représente les variations de la turbidité en fonction du temps,
- la figure 8C représente les variations du rapport isotopique [masse 31/(masses 30+31)] en fonction du temps,
- 5 - la figure 8D représente les variations de la production de NO en fonction de la turbidité.

Chacune de ces figures concerne la souche TL223 cultivée sur un milieu YEL seul, en présence de 1 mM de nitrate ( $^{15}\text{NO}_3^-$  - marqué à 50 % et  $^{14}\text{NO}_3^-$ ) et en présence  
10 de 1 mM de nitrite.

Les barres verticales représentent  $\pm$  l'écart type de la moyenne pour  $n = 3$  lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole.

Ces figures prouvent que l'accumulation de NO chez TL223 cultivé sur 1 mM de  $\text{KNO}_3$  (marqué à l'azote 15 ou non marqué) ou sur 1 mM de  $\text{KNO}_2$  est proche de 7  $\mu\text{g}$  de NO/ml après 48 heures d'incubation à 30°C ; cette valeur est 3,5 fois supérieure à la production de NO dans le cas d'un milieu YEL non supplémenté en nitrate ou en nitrite  
15 (figure 8A). Ces différences ne sont pas dues à des variations de croissance engendrées par la composition du milieu car la turbidité en fin de croissance, est du même ordre de grandeur sur un milieu YEL seul (4,5 unités DO après 72 heures) et sur un même milieu additionné en nitrate ou en nitrite (environ 5 unités DO après 72 heures  
20 - figures 8B et 8D).

La figure 8C révèle que l'apport de  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  marqué à 50 % permet d'obtenir du NO avec un marquage à environ 40 % après 48 heures d'incubation : l'azote de masse 15 apporté sous forme de nitrate est donc retrouvé dans le NO synthétisé par la souche TL223.  
30

On a, en outre observé que lorsque la souche TL223 est cultivée sur  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$ , le profil du pic de masse 31 ( $^{15}\text{N}^{16}\text{O}$ ) augmente très fortement par rapport au NO analysé sur un milieu YEL contenant du nitrate non marqué, ce qui permet de confirmer cette situation.  
35

De plus, l'addition de 1 mM de  $\text{KNO}_3$  ou de  $\text{KNO}_2$  non marqué entraîne une production de NO avec un rapport

isotopique de 0,75 % (48 heures d'incubation - figure 8C), ce qui est très proche des valeurs du rapport isotopique naturel du NO (environ 0,4 %).

Ces dernières observations confirment de manière très claire que le gaz analysé en spectrométrie de masse était bien du NO.

Ces essais ont donc permis de constater que la souche TL223 est capable de synthétiser du NO directement à partir de nitrite ou en présence de nitrate après réduction de celui-ci en nitrite.

Sur la base des valeurs du rapport isotopique obtenues sur milieu YEL additionné de 1 mM de  $K^{15}NO_3$  marqué à 50 %, il est possible de déduire le taux de conversion du nitrate en nitrite : ainsi, environ 20% du  $K^{15}NO_3$  apporté est transformé en monoxyde d'azote par la souche TL223.

Le nitrate, initialement présent dans le milieu YEL stérile, explique la production de NO observée chez TL223 (de l'ordre de 2  $\mu g$  de NO/ml après 72 heures d'incubation - figure 7).

Les variations de la production de NO en fonction de la concentration en nitrite ou en nitrate sont représentées sur la figure 9. Plus précisément :

- la figure 9A représente les variations de la production de NO et l'évolution de la turbidité en fonction de la concentration initiale en nitrate, chez la souche TL223 cultivée sur milieu YEL après 72 heures d'incubation,
- la figure 9B représente les variations de la production de NO et l'évolution de la turbidité en fonction de la concentration initiale en nitrite, chez la souche TL223 cultivée sur milieu YEL après 72 heures d'incubation,
- la figure 9C représente les variations du taux de conversion du nitrate en NO, en fonction de la concentration initiale en nitrate,
- la figure 9D représente les variations du taux de conversion du nitrite en NO, en fonction de la concentration initiale en nitrite.



Sur ces figures, les concentrations en nitrate ont été corrigées en tenant compte de la présence d'environ 50  $\mu\text{M}$  de nitrate dans le milieu YEL seul et sont les suivantes : 100, 150, 350, 550, 650 et 1050  $\mu\text{M}$ .

5 Les concentrations en nitrite sont les suivantes : 50, 100, 400, 800 et 1000  $\mu\text{M}$ .

Ces figures montrent que pour les gammes choisies, la production de monoxyde d'azote par la souche TL223 est proportionnelle à la concentration initiale en nitrate (figure 9A) ou en nitrite (figure 9B) du milieu YEL. Cette relation est linéaire.

10 Dans les deux cas, aucune phase de plateau n'a été observée, ce qui laisse supposer que les concentrations en nitrate ou nitrite utilisées ne permettent pas d'obtenir le niveau maximum d'accumulation de NO par la bactérie propionique TL223.

Il est également à noter que la présence de fortes concentrations en nitrate ou en nitrite n'affecte pas la croissance bactérienne vu que les valeurs de turbidité à 72 heures sont très proches pour toutes les concentrations qui ont été testées.

20 Il convient, par ailleurs, de souligner que les droites obtenues sur les figures 9A et 9B sont superposables, ce qui permet de prouver que le NO produit provient directement du nitrite ou du nitrate via la réduction de celui-ci en nitrite.

De plus, ces résultats montrent que chez la souche TL223, l'étape de réduction du nitrate en nitrite n'est pas limitante pour les concentrations en nitrate choisies dans cette expérimentation.

30 Il est également important de souligner que le taux de conversion du  $\text{NO}_3^-$  (figure 9C) et du  $\text{NO}_2^-$  (figure 9D) évolue en fonction de la quantité de substrat disponible, passant de 20 à 60 % lorsque la concentration en  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NO}_2^-$  passe de 1000 à 100  $\mu\text{M}$ .

35 Ceci suggère que la production de NO est fortement régulée et qu'elle est prioritaire par rapport à

l'utilisation de l'azote nitrique pour les synthèses azotées.

A partir des conclusions susmentionnées, on a étudié la production de NO chez 12 souches de bactéries propioniques de deux espèces différentes. Les résultats de ces essais sont résumés ci-dessous :

6 - Etude de la production de NO chez différentes souches propioniques

Conformément à cet essai, les souches de bactéries propioniques retenues ont été les suivantes :

*P.freudenreichii* : LS410, LS2501, LS2502, ITG 23, CNRZ89, CNRZ277, CNRZ81.

*P.acidipropionici* : TL223, NCDO1072, PR75, CNRZ80, CNRZ86, CNRZ287.

Il est à noter que les souches CNRZ80, CNRZ81, CNRZ86, CNRZ89, CNRZ277 et CNRZ287 appartiennent à la collection publique INRA-CNRZ tandis que la souche NCDO1072 appartient à la collection britannique National Collection of Dairy Organisms ; les autres souches appartiennent quant à elles à des collections privées.

Après ensemencement sur milieu YEL en présence de 550  $\mu$ M de nitrate, les cultures bactériennes ont immédiatement été réparties par 5 ml dans des tubes étanches et flushées à l'hélium (conditions anaérobies). Ensuite, les souches propioniques ont été soumises aux conditions expérimentales suivantes :

- incubation à 30°C pendant 24, 48 et 72 heures,
- 3 répétitions,
- accumulation du NO dans l'atmosphère et détermination du rapport isotopique par spectrométrie de masse,
- estimation de la fermentation de chaque culture mesurée par lecture de l'absorbance à 650 nm,
- dosage du nitrate et du nitrite après récupération des milieux bactériens, centrifugation et mesure par kit Boehringer.

La figure 10 représente les variations de l'accumulation de NO en fonction du temps chez la souche

TL223 et les 12 autres souches de bactéries propioniques, cultivées sur un milieu YEL en présence de 550  $\mu\text{M}$  de nitrate. La souche TL223 a été représentée dans chaque cas dans un but de comparaison.

5 Les barres verticales représentent  $\pm$  l'écart type de la moyenne pour  $n=3$  lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole.

Cette figure montre l'existence de fortes divergences entre les souches propioniques.

10 De manière globale, en comparant les niveaux de production de NO après 72 heures d'incubation, on peut classer les souches en trois catégories :

- souches capables de produire de 4 à 4,5  $\mu\text{g}$  NO/ml : TL223, CNRZ80, NCDO1072 et PR75. Le rapport isotopique  
15 du NO produit par ces souches est compris entre 2 et 2,5 % (T=72 h),
- souches capables de produire environ 2  $\mu\text{g}$  NO/ml : CNRZ81, CNRZ86, CNRZ89, CNRZ277, LS2502, ITG23. Le rapport isotopique du NO produit par ces souches se situe  
20 entre 4 et 5,5 % (T=72 h),
- souches produisant moins de 1  $\mu\text{g}$  NO/ml : LS410, LS2501 et CNRZ287. Malgré la présence de 550  $\mu\text{M}$  de nitrate dans le milieu de culture, ces 3 souches n'ont produit que de très faibles quantités de NO et le rapport iso-  
25 topique était de l'ordre de 10 à 13 % (T=72 h). Ces valeurs suggèrent que les pics de masses 30 et 31 détectés chez ces bactéries pourraient ne pas correspondre à du monoxyde d'azote.

Il est à noter que chez les souches appartenant  
30 aux deux premières catégories, le NO produit ne diminue pas en fin de croissance et qu'il ne semble donc pas réutilisé par les bactéries propioniques : il y a donc accumulation du NO.

La figure 11 représente les variations de la pro-  
35 duction de NO en fonction de la turbidité chez les 13 souches de bactéries propioniques susmentionnées, cultivées sur milieu YEL en présence de 550  $\mu\text{M}$  de nitrate.

la souche TL223 a été représentée dans chaque cas dans un but comparatif.

Les barres verticales représentent  $\pm$  l'écart type de la moyenne pour  $n=3$ , lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole.

La figure 12 représente les variations de la turbidité (DO à 650 nm) en fonction du temps chez les 13 souches de bactéries propioniques analysées, cultivées sur milieu YEL en présence de 550  $\mu$ M de nitrate.

La souche TL223 est représentée, dans chaque cas, dans un but comparatif.

Les barres verticales représentent l'écart type de la moyenne pour  $n=3$ , lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole.

Les souches produisant le plus de NO (TL223, CNRZ80, NCDO1072 et PR75) atteignent toutes des valeurs de turbidité élevées (4 à 5 unités DO après 72 heures d'incubation).

Parmi ces souches, il est à noter que les bactéries NCDO1072 et PR75 croissent moins vite que TL223, mais sont capables d'accumuler très rapidement de fortes concentrations en NO.

Ainsi, PR75 produit 2,8  $\mu$ g de NO/ml pour une turbidité de 0,5 unités DO. Le maximum de production de NO est enregistré pour des valeurs de turbidité d'environ 1,5 unité DO pour NCDO1072 et PR75, contre 3,4 unités DO pour TL223.

Pour « affiner » ces résultats, on a analysé l'évolution des concentrations en NO, nitrate et nitrite des milieux de culture des 13 souches de bactéries propioniques étudiées en fonction du temps d'incubation.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-dessous dans lequel les concentrations sont exprimées en  $\mu$ M. Pour chaque souche, les mesures ont été effectuées sur un tube, après élimination des bactéries par centrifugation.

	Concentration en $\text{NO}_3^-$			Concentration en $\text{NO}_2^-$			Production de $\text{NO}$		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
<i>P. freudenreichii</i>									
LS410	674	638	596	0	5	22	13	18	23
LS2501	645	649	406	6	13	215	12	26	35
LS2502	338	0	0	176	122	16	12	53	72
ITG23	441	218	24	11	246	278	10	36	62
CNRZ89	595	160	42	16	171	154	10	38	74
CNRZ277	559	435	246	17	3	85	12	42	66
CNRZ81	0	0	0	400	12	0	26	66	71
<i>P. acidipropionici</i>									
TL223	0	0	0	271	0	0	71	149	152
NCDO1072	0	2	0	370	3	0	50	148	146
PR75	11	2	0	185	1	0	91	147	146
CNRZ80	0	0	0	146	0	0	93	136	140
CNRZ86	594	491	0	14	41	405	9	28	62
CNRZ287	624	570	646	0	0	5	9	20	29

Ce tableau permet de faire les constatations suivantes :

- 5 les souches produisant 4  $\mu\text{g NO/ml}$  sont capables de réduire entièrement le nitrate disponible (soit 550  $\mu\text{M}$ ) après 24 heures d'incubation. De plus, elles peuvent réduire totalement le nitrite obtenu au cours des 48 premières heures d'incubation.
- 10 les souches LS410 et CNRZ287, très faibles productrices de  $\text{NO}$ , ne sont pas capables d'absorber significativement le nitrate présent dans le milieu.
- chez les souches présentant une accumulation intermédiaire de  $\text{NO}$ , on peut observer des évolutions des teneurs en nitrate et en nitrite très différentes traduisant des vitesses d'absorption du  $\text{NO}_3^-$  et/ou de réduction du  $\text{NO}_3^-$  et du  $\text{NO}_2^-$  très différentes. Ainsi, la souche CNRZ81 est capable de réduire la totalité du nitrate après 24 heures d'incubation. Après 48 heures,
- 15

CNRZ81 réalise également la réduction de l'ensemble du  $\text{NO}_2^-$  obtenu par réduction du  $\text{NO}_3^-$ . A l'opposé, CNRZ277 possède encore  $246 \mu\text{M}$  de  $\text{NO}_3^-$  et  $85 \mu\text{M}$  de  $\text{NO}_2^-$  après 72 heures d'incubation.

5 Les essais résumés ci-dessus ont révélé que certaines souches propioniques sont capables de réduire le nitrate du milieu de culture et de fournir ainsi le nitrite nécessaire à la synthèse de NO.

10 Il est à noter que les souches propioniques qui produisent le plus de NO (TL223, CNRZ80, NCD01072 et PR75) appartiennent toutes à l'espèce *P.acidipropionici* et possèdent, en outre, toutes une activité nitrate réductase.

15 A l'inverse, les souches produisant apparemment moins, voire pas du tout, de NO (limite de détection du spectromètre de masse) sont également des bactéries qui ne possèdent pas d'activité nitrate réductase connue (LS410, LS2501 et CNRZ287).

20 Pour certaines souches propioniques, il semble que la cinétique de production de NO ne soit pas directement liée à l'activité nitrate réductase.

Compte tenu de ces résultats, l'invention se rapporte également à une composition diététique ou médicamenteuse absorbable, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une préparation renfermant une quantité importante de préférence plus de  $10^9$  cellules/g; de souches de bactéries propioniques sélectionnées en fonction de leur capacité à dégager et/ou à accumuler du monoxyde d'azote à raison d'au moins  $1 \mu\text{g/ml}$  de milieu YEL contenant  $550 \mu\text{M}$  de nitrate.

30 Selon une autre caractéristique de l'invention, cette composition renferme des bactéries propioniques appartenant à au moins l'une des souches TL223, CNRZ80, CNRZ86 et NCD01072 de l'espèce *P.acidipropionici*.

Parmi ces souches, la souche TL223 s'est révélée particulièrement avantageuse.

35 Il est également à noter que la souche CNRZ80 présente un intérêt tout particulier d'un point de vue « productivité » vu qu'elle est capable d'accumuler une con-

centration importante de NO; ce très rapidement (pour des valeurs de turbidité relativement faibles).

Selon une autre caractéristique de l'invention, cette composition renferme des bactéries propioniques appartenant à au moins l'une des souches ITG23, CNRZ81, CNRZ89, CNRZ277 et LS2502 de l'espèce *P. freudenreichii*.

Il est à noter que, conformément à une autre caractéristique de l'invention, la composition peut également renfermer d'autres bactéries telles que des bifidobactéries et/ou des bactéries lactiques.

Pour compléter les résultats obtenus ci-dessus, on a effectué des tests sur deux types de bactéries non propioniques : *E. coli* et *Lactobacillus farciminis* connues pour leur aptitude à réduire les nitrites.

Les résultats de ces tests sont résumés ci-dessous :

#### 7 - Etude de la production de NO par les souches *E. coli* et *L. farciminis*

Ces tests complémentaires ont principalement été effectués compte tenu de l'existence de la publication « Heme-dependent and heme-independent nitrite reduction by lactic acid bacteria results in different N-containing products » Gudrun Wolf, Elke K. Arendt, Ute Pfähler and Walter P. Hammes - International Journal of Food Microbiology, 10 (1990) 323-330 qui mentionne que certaines bactéries lactiques (*L. farciminis*) sont capables de produire du monoxyde d'azote à partir de nitrite.

Des expériences préliminaires ont montré qu'après 5 h 30 de croissance de la souche *L. farciminis* dans du MRS additionné de 1 mM de nitrate, on ne détectait plus de nitrate ni de nitrite dans le milieu de culture.

La même constatation a été faite en ce qui concerne la souche *E. coli* après 7 h 30 de croissance sur milieu BHI additionné de 1 mM de nitrate.

Il est connu, qu'au cours de sa croissance, la souche *L. farciminis* acidifie le milieu MRS (environ pH 5 après 5-6 heures de culture).

Or, on a pu constater, à partir d'essais réalisés sur milieu YEL, que les nitrites se transforment en NO en milieu acide.

Ces essais ont été réalisés dans les conditions expérimentales suivantes :

- acidification du milieu YEL par de l'HCl,
- apport de nitrite à une concentration de 400  $\mu$ M,
- autoclavage des milieux,
- trois répétitions.

Les résultats obtenus sont rassemblés sur la figure 13 qui représente les variations en fonction du pH de la production de NO dans le milieu YEL additionné de nitrites après incubation à 37°C pendant 24 heures.

Cette figure est de nature à prouver qu'il existe une production notable de NO à partir du nitrite du milieu lorsque celui-ci est acide, cette production augmentant lorsque le pH diminue.

Par suite, on a effectué des tests comparatifs de la production de NO par *L.farciminis* et par *E.coli* qui est réputée non productrice de NO (Brittain T, Blackmore R, Greenwood C. & Thomson AJ (1992) - Bacterial nitrite - reducing enzymes - Eur. J. Bio. Chem., 209, 793-802).

Ces tests ont été réalisés dans les conditions suivantes :

- incubation à 37°C sur milieu BHI (*E.coli*) ou MRS (*L.farciminis*),
- apport de nitrate dans le milieu à une concentration de 1 mM,
- flushage de l'atmosphère de chaque tube par de l'hélium pendant 100 secondes,
- trois répétitions,
- mesure de la turbidité en fin d'incubation.

Ces essais ont permis d'obtenir les résultats rapportés sur la figure 14.

Plus précisément :

- la figure 14A représente les variations de la production de NO en fonction du temps d'incubation,



- la figure 14B représente les variations de la production de NO en fonction de la turbidité du milieu.

Il est à noter que les valeurs obtenues pour la production de NO sont toutes nettement inférieures au seuil de 1  $\mu\text{g/ml}$  qui a été considéré ci-dessus comme significatif :  
5 il en résulte qu'il n'y a pas accumulation de NO dans les tubes de culture.

Ces résultats indiquent donc que l'absence de nitrate et de nitrite observée dans l'expérience préliminaire après respectivement 5 h 30 (*L.farciminis*) et 7 h 30 (*E.coli*)  
10 n'est pas compensée par une accumulation de NO qui pourrait être soit d'origine chimique (liée à l'acidification du milieu) soit d'origine bactérienne.

Ces résultats ont été, dans le cas de la souche *L.farciminis*, confirmés par des tests effectués sur des bactéries se trouvant sous forme de resting cells à pH régulé à 6,5 par un tampon phosphate contenant du lactate dans les conditions opératoires suivantes :

- incubation à 37°C,
- 20 - apport de nitrite à une concentration de 400  $\mu\text{M}$ ,
- flushage de l'atmosphère de chaque tube par de l'hélium pendant 100 secondes,
- trois répétitions,
- mesure de la turbidité en fin d'incubation.

25 Cette analyse a permis d'obtenir les résultats rapportés sur la figure 15 :

- la figure 15A représente les variations de la production de NO en fonction du temps d'incubation,
- la figure 15B représente les variations de la production de  
30 NO en fonction de la turbidité.

Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment, à savoir que les quantités de NO produites sont trop faibles pour être significatives et donc que la souche *L.farciminis* n'est pas susceptible d'accumuler le monoxyde d'azote. Il est toutefois possible que cette souche produise  
35 du monoxyde d'azote en début de croissance, mais que le NO éventuellement produit soit réutilisé par la bactérie.

Des essais complémentaires ont été réalisés sur les souches TL223 et CNRZ80 sous forme de resting cells après incubation à 30 et également à 37°C.

5 8 - Evolution de la production de NO par des bactéries propioniques sous forme de resting cells

Cette expérimentation a été effectuée dans les conditions suivantes :

- resting cells suspendues dans un tampon phosphate contenant
- 10 du lactate à pH 6,5;
- incubation à 30°C ou à 37°C,
- apport de nitrite à une concentration de 400 µM,
- flushage de l'atmosphère de chaque tube par de l'hélium pendant 100 secondes,
- 15 - trois répétitions,
- mesure de la turbidité en fin d'incubation.

Il est à noter que lors des tests relatifs à l'incubation à 30°C, on a examiné, outre les souches TL223 et CNRZ80, la souche CNRZ81 avec une concentration bactérienne

20 doublée.

Cette expérimentation a permis d'obtenir les résultats rapportés sur les figures 16 et 17. Plus précisément :

- la figure 16A représente les variations de la production de
- 25 NO par des resting cells à 30°C en fonction de la durée d'incubation,
- la figure 16B représente les variations de la production de NO par des resting cells à 30°C en fonction de la turbidité du milieu,
- 30 - la figure 17A représente les variations de la production de NO par des resting cells à 37°C en fonction de la durée d'incubation,
- la figure 17B représente les variations de la production de NO par des resting cells à 37°C en fonction de la turbidité
- 35 du milieu.

Ces résultats sont de nature à prouver qu'il existe une production conséquente de NO par des resting cells non seulement dans le cas des deux souches de l'espèce

*P.acidipropionici* (TL223 et CNRZ80) mais également dans le cas de la souche de l'espèce *P.freundenreichii* (CNRZ81). La souche TL223 est la plus productive.

Globalement, à des concentrations identiques de bactéries, la production de NO par des resting cells est du même ordre que celle observée dans le cas de bactéries cultivées sur milieu YEL.

La production de NO par des resting cells intervient essentiellement lors des cinq premières heures d'incubation ; au-delà de cette période, la production est faible.

On a ainsi pu observer qu'à 37°C, la production de NO est identique (TL223) ou légèrement supérieure (CNRZ80) à celle obtenue à 30°C.

Les avantages associés à l'ingestion de bactéries propioniques ont, en outre, été vérifiés par des investigations réalisées in vivo chez l'homme sain.

#### 9 - Etude de l'effet de l'ingestion de bactéries propioniques sur le transit intestinal chez l'homme sain

Cette étude a été réalisée en milieu hospitalier au CHU de Caen sur une série de 19 sujets masculins volontaires sains.

Au début de ce test, on a fait absorber quotidiennement à chaque volontaire 10 marqueurs radio opaques, ce pendant 8 jours consécutifs, conformément au protocole décrit dans les publications Arhan P, Devroede G, Jehannin B et coll. *Dis Colon Rectum* 1981 ; 24:625-9. et Bouchoucha M, Devroede G. Arhan P et coll. *Dis Colon Rectum* 1992 ; 35:773-82.

Selon ce protocole, l'étude du transit est effectuée par comptage des marqueurs radio opaques ingérés dans les différentes aires de la cavité abdominale répartis sur un cliché d'abdomen de face. Ces aires (côlon droit, côlon gauche et rectosigmoïde) sont définies par des lignes fictives joignant la 5<sup>ème</sup> vertèbre lombaire au contour de la cavité pelvienne. Le temps de transit est calculé selon la formule  $T = 1/N \cdot n \cdot \Delta t$  ; N étant

égal à 10 marqueurs,  $n$  représentant le nombre de marqueurs comptés dans une région et  $\Delta t$  étant égal à 24 heures.

5 Le jour suivant cette ingestion, c'est-à-dire le 9<sup>ième</sup> jour, on a fait subir aux volontaires une radiographie de l'abdomen de face sans préparation.

10 A partir du jour suivant, c'est-à-dire du 10<sup>ième</sup> jour, on a fait ingérer quotidiennement à chaque volontaire, ce pendant 2 semaines, une gélule contenant 5  $10^{10}$  bactéries propioniques issues d'une banque de souches utilisées dans l'industrie fromagère, donc parfaitement inoffensives pour l'homme.

15 Une seconde étude du temps de transit similaire à la première a été effectuée durant la seconde semaine d'ingestion des propioniques, c'est-à-dire du 17<sup>ième</sup> au 26<sup>ième</sup> jour.

20 Cette étude a révélé un ralentissement significatif du temps de transit du côlon gauche ( $p < 0,05$  conformément au test statistique Wilcoxon Matched-Paired Signed-Ranks Test.) ; les temps de transit du colon droit et du rectosigmoïde n'ont pas été significativement modifiés par l'ingestion des propioniques.

25 Cette étude a donc permis de prouver que l'ingestion de bactéries propioniques a une influence sur la motricité intestinale ; on peut supposer que ces résultats sont liés à la synthèse de monoxyde d'azote par les bactéries propioniques.

REVENDICATIONS

- 1°) Utilisation de bactéries propioniques pour l'obtention d'une composition d'alimentation courante ou d'une composition diététique ou médicamenteuse absorbable susceptible de  
5 dégager des quantités physiologiquement significatives de monoxyde d'azote dans le tube digestif humain ou animal.
- 2°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que  
10 la composition est constituée par une préparation déshydratée.
- 3°) Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que  
15 la composition se présente sous forme de fractions individuelles renfermant la dose de bactéries devant être absorbée régulièrement.
- 4°) Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que  
20 chaque fraction individuelle renferme plus de  $10^9$  bactéries.
- 5°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que  
25 la composition est constituée par une préparation liquide fermentée ou non.
- 6°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que  
30 la composition est une préparation élaborée, les bactéries propioniques étant ajoutées ou incorporées dans des aliments tels que des fromages ou des fibres alimentaires.
- 7°) Composition diététique ou médicamenteuse absorbable,  
35 caractérisée en ce qu'  
elle est constituée par une préparation renfermant une quantité importante de préférence plus de  $10^9$  cellules/g de souches de bactéries propioniques sélectionnées en fonction de

leur capacité à dégager et/ou à accumuler du monoxyde d'azote à raison d'au moins 1  $\mu\text{g/ml}$  de milieu YEL contenant 550  $\mu\text{M}$  de nitrate.

5 8°) Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle renferme des bactéries propioniques appartenant à au moins l'une des souches TL223, CNRZ80, CNRZ86 et NCDO1072 de l'espèce *P.acidipropionici*.

10

9°) Composition selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle renferme des bactéries propioniques appartenant à la souche TL223 de l'espèce *P.acidipropionici*.

15

10°) Composition selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle renferme des bactéries propioniques appartenant à la souche CNRZ80.

20

11°) Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle renferme des bactéries propioniques appartenant à au moins l'une des souches ITG23, CNRZ81, CNRZ89, CNRZ277 et  
25 LS2502 de l'espèce *P.freudenreichii*.

12°) Composition selon l'une quelconque des revendications 7 à 11, caractérisée en ce qu'elle renferme en outre d'autres bactéries telles que des bi-  
30 fidobactéries et/ou des bactéries lactiques

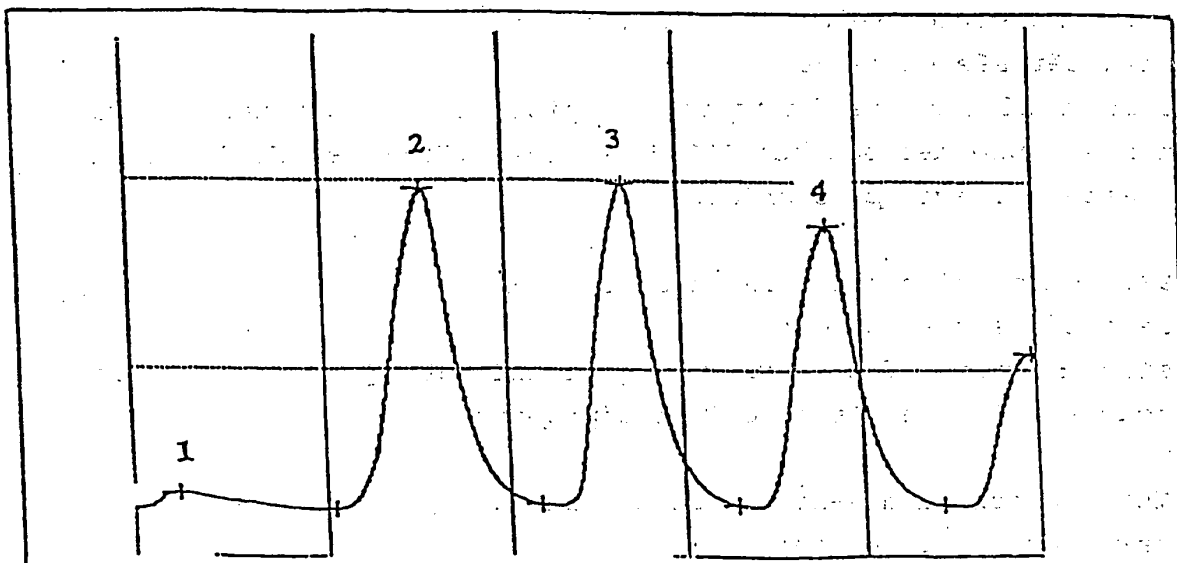


Figure 1

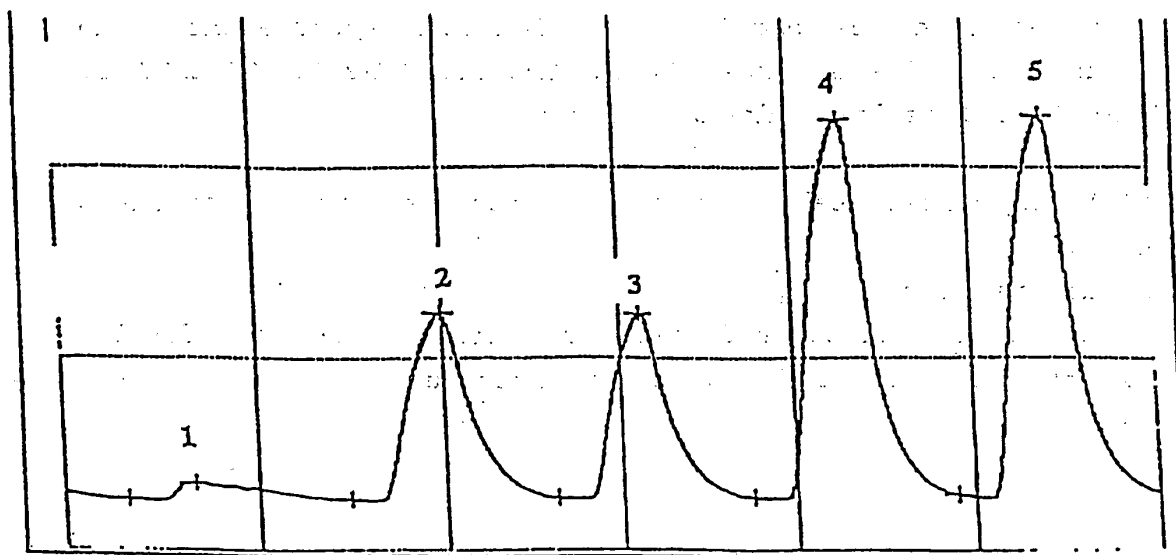


Figure 2

2/12

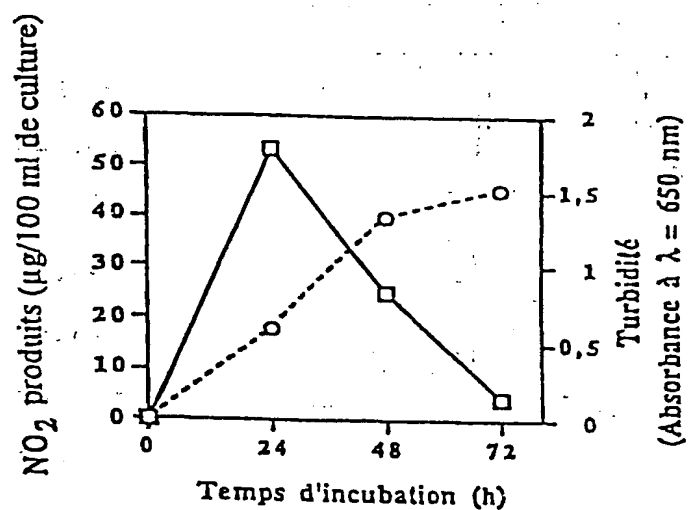


Figure 3

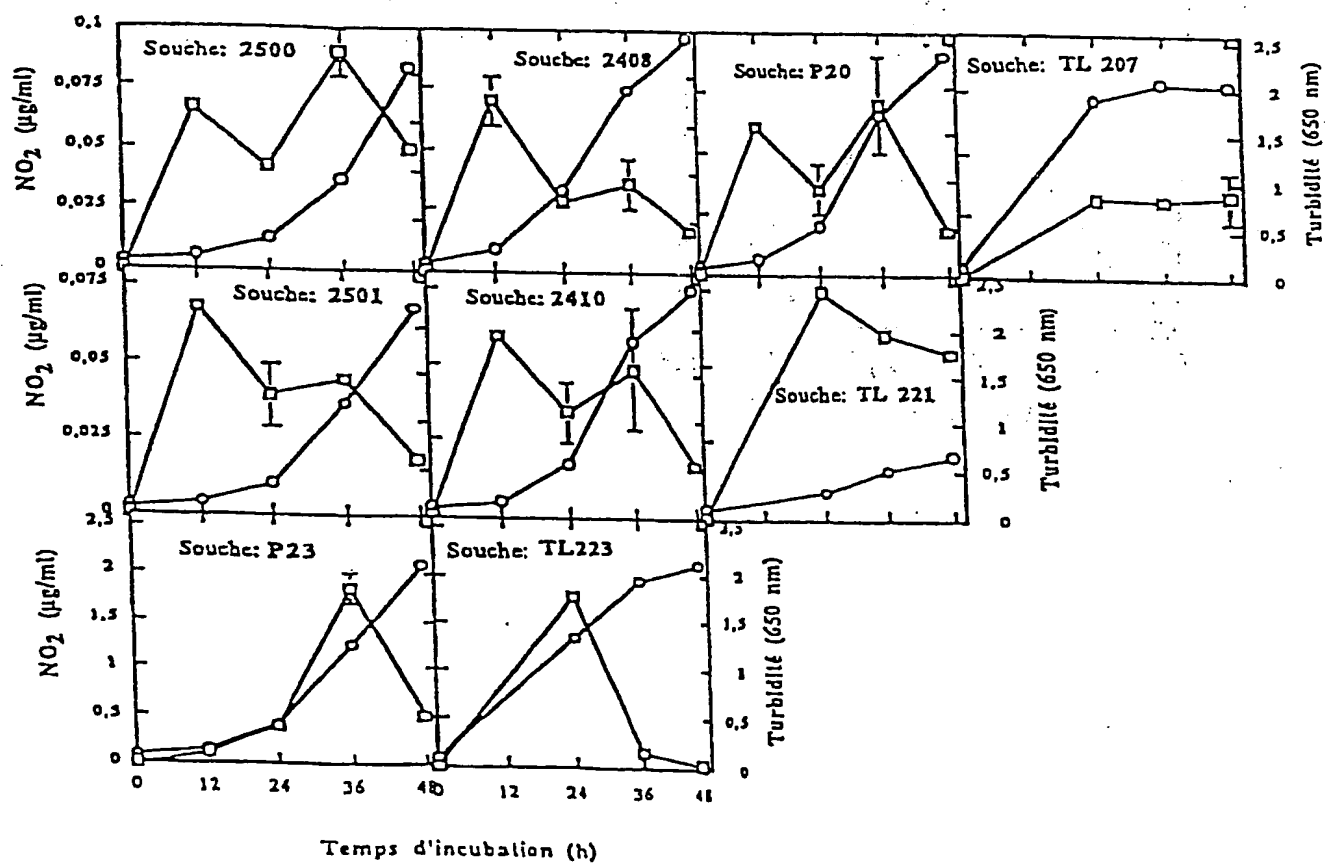


Figure 4



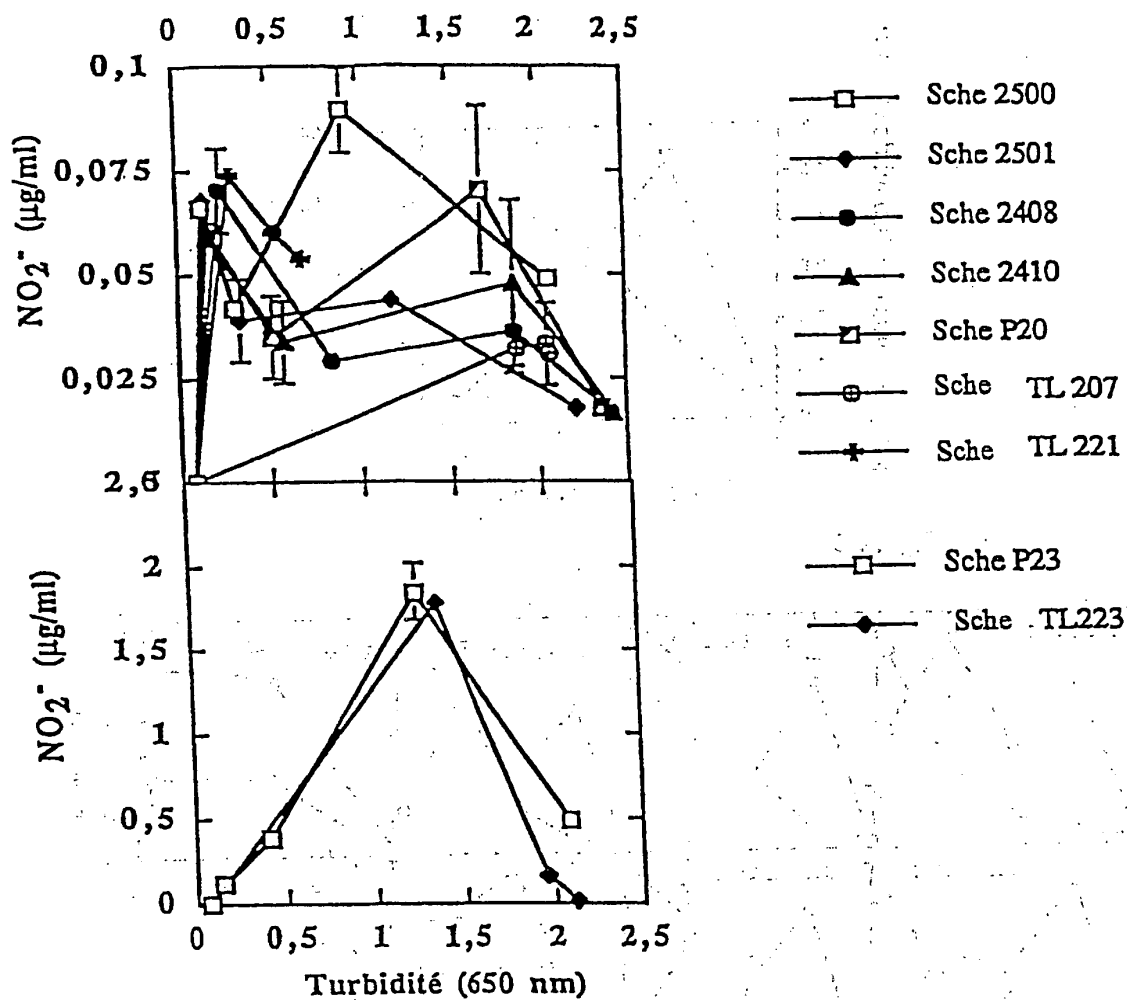


Figure 5

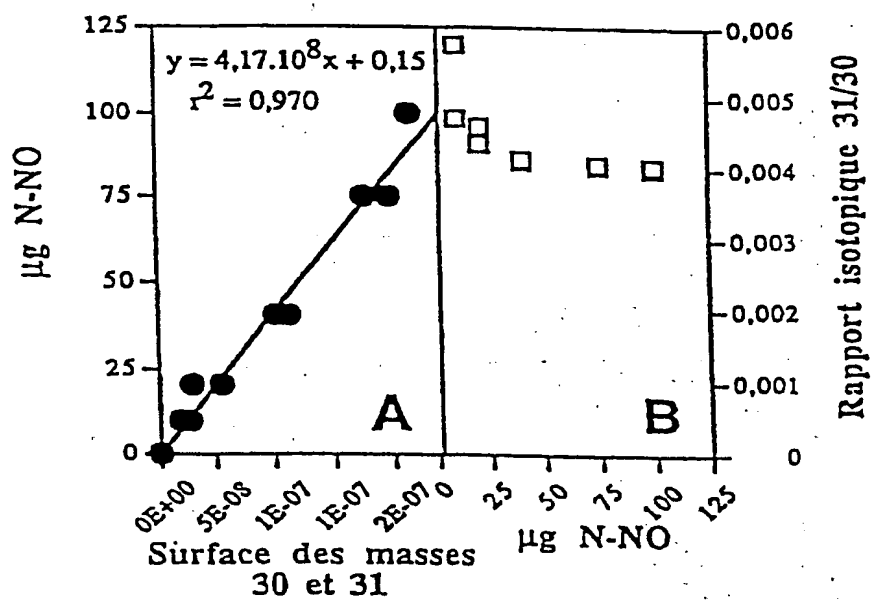


Figure 6

5/12

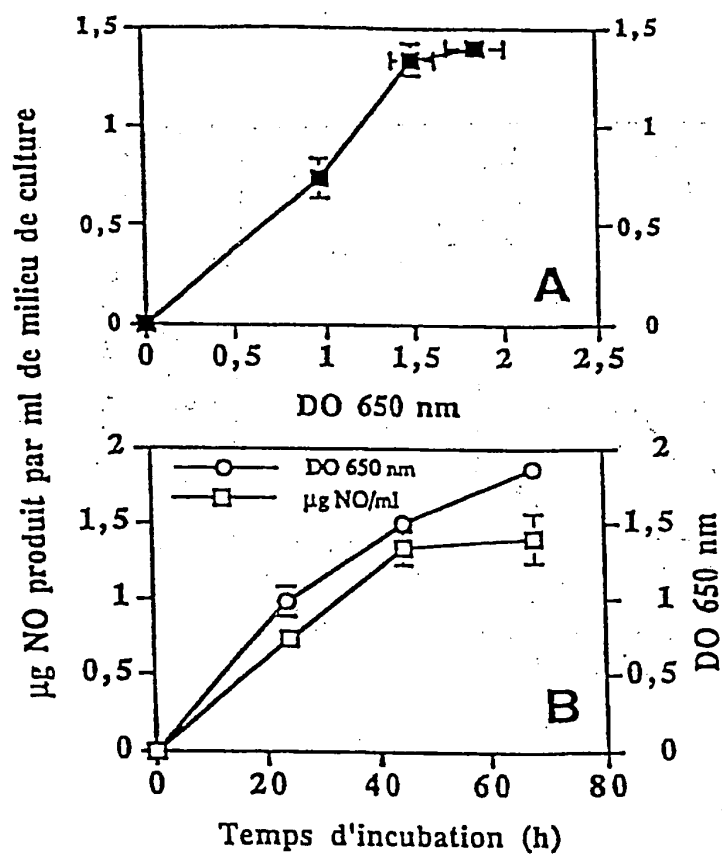


Figure 7.

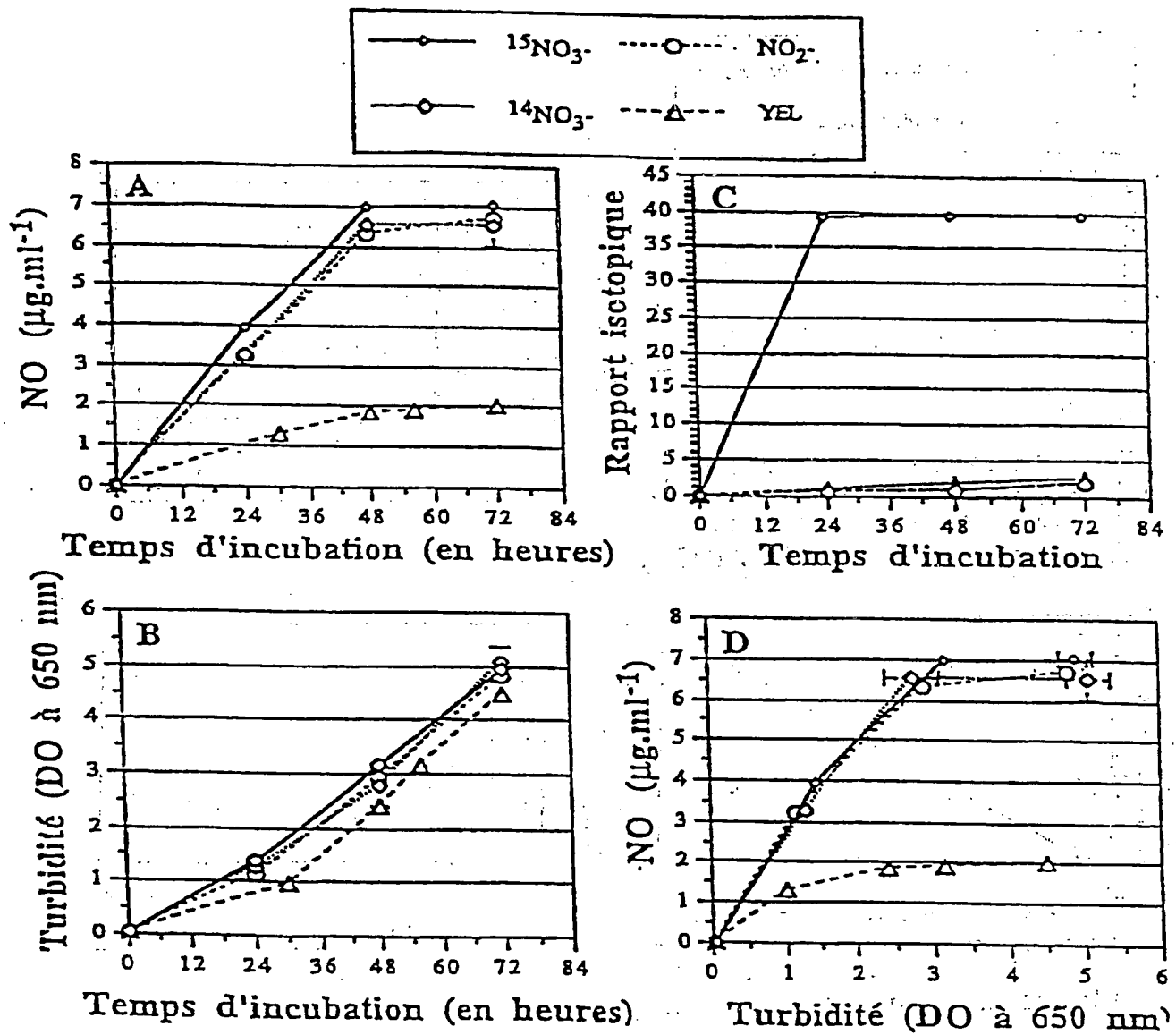


Figure 8

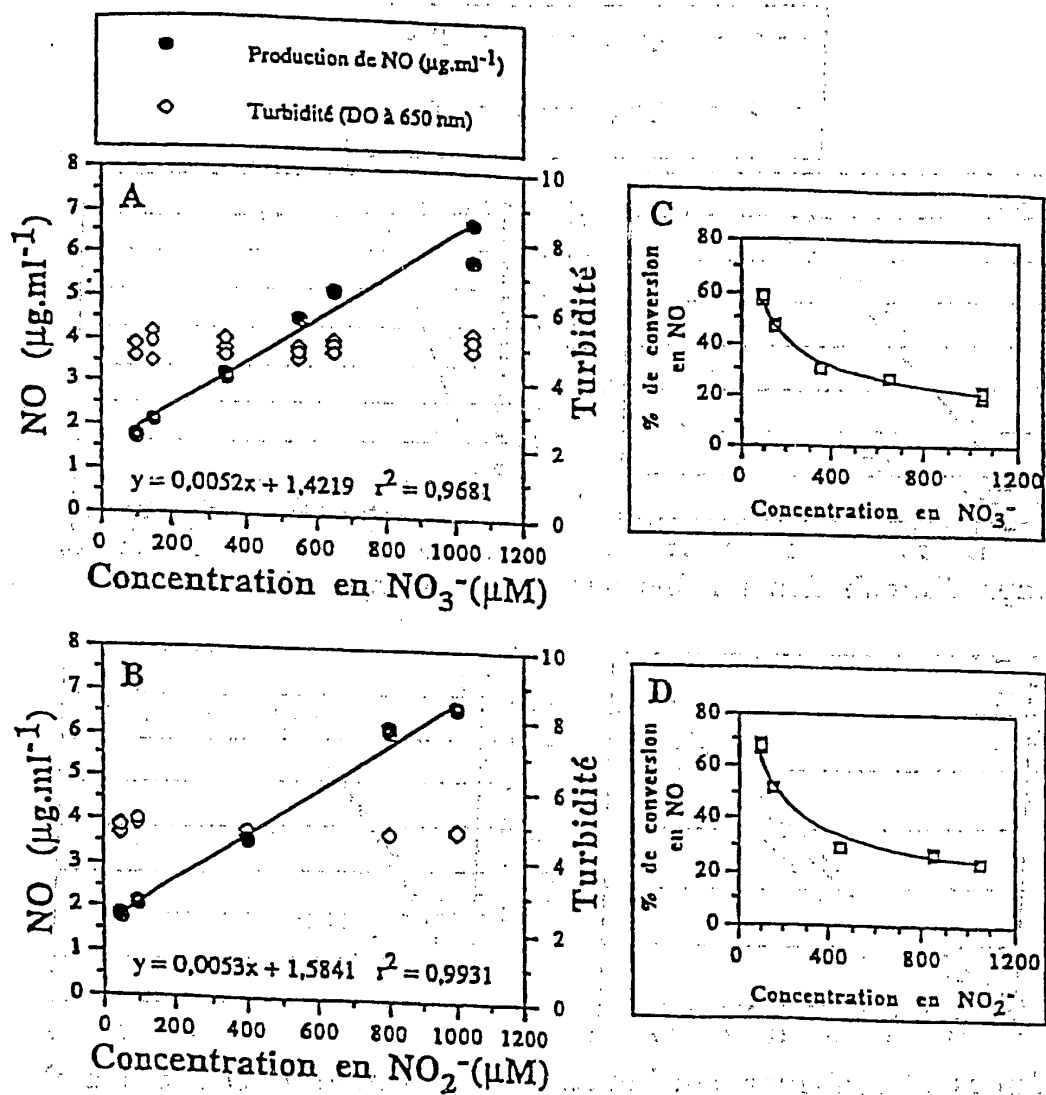


Figure 9

8/12

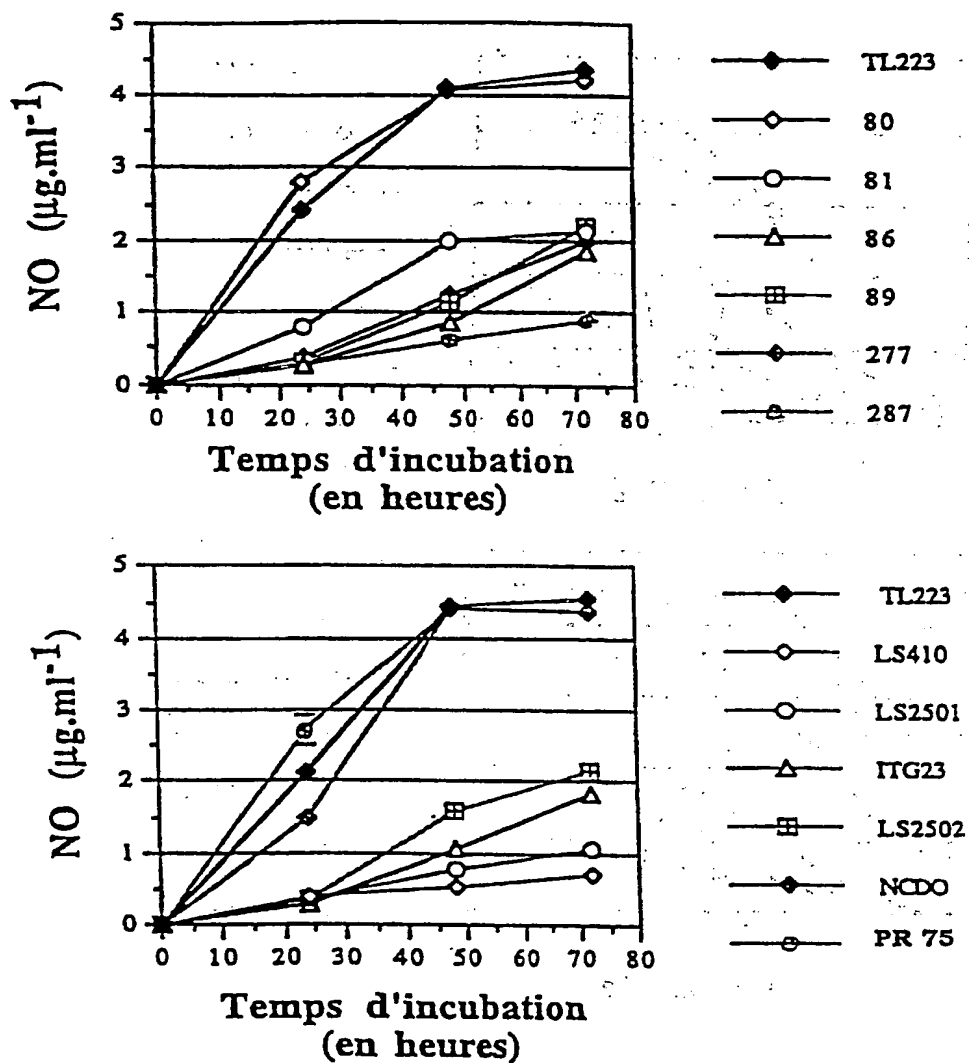


Figure 10

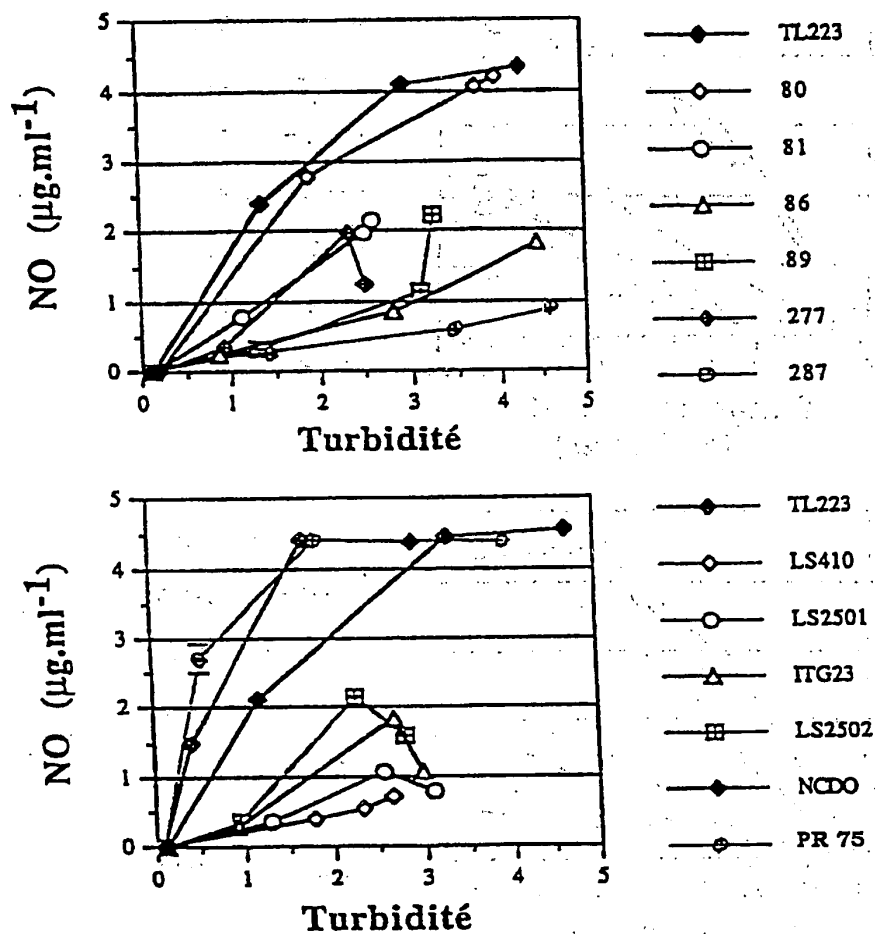


Figure 11

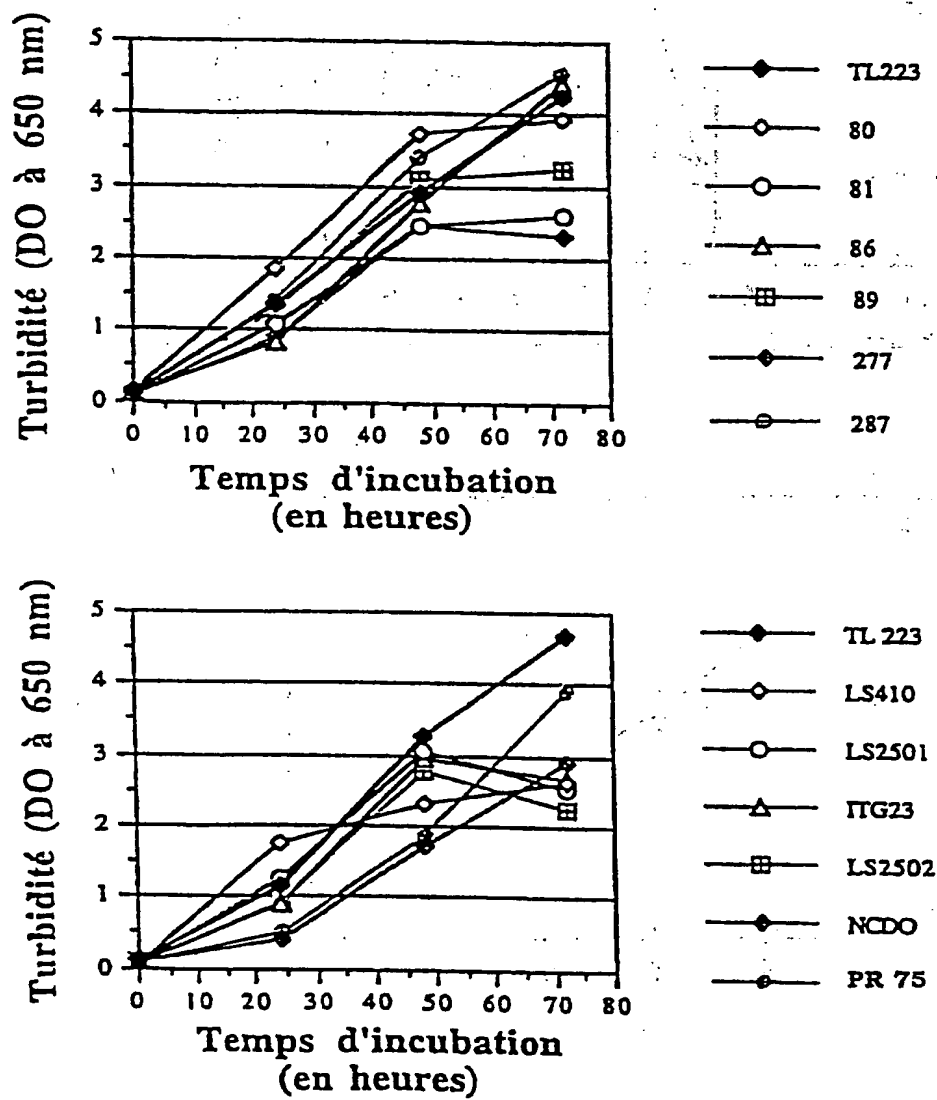


Figure 12



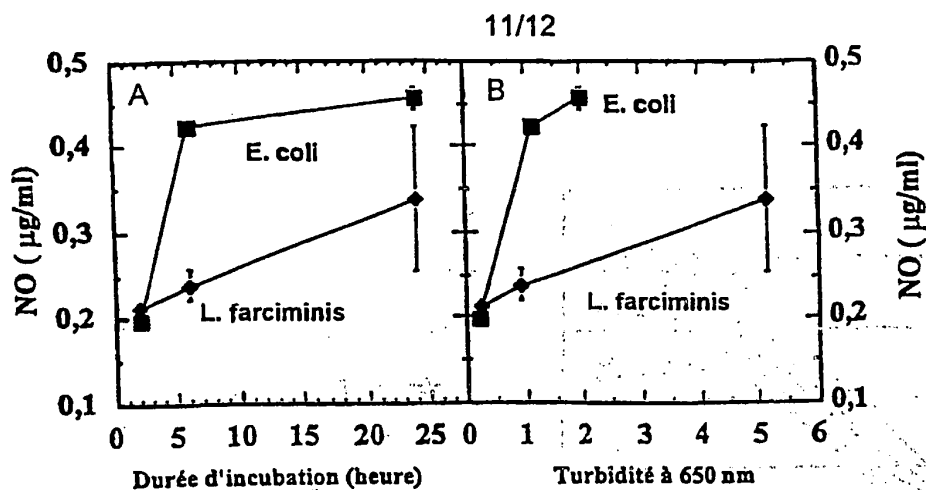


Figure 14

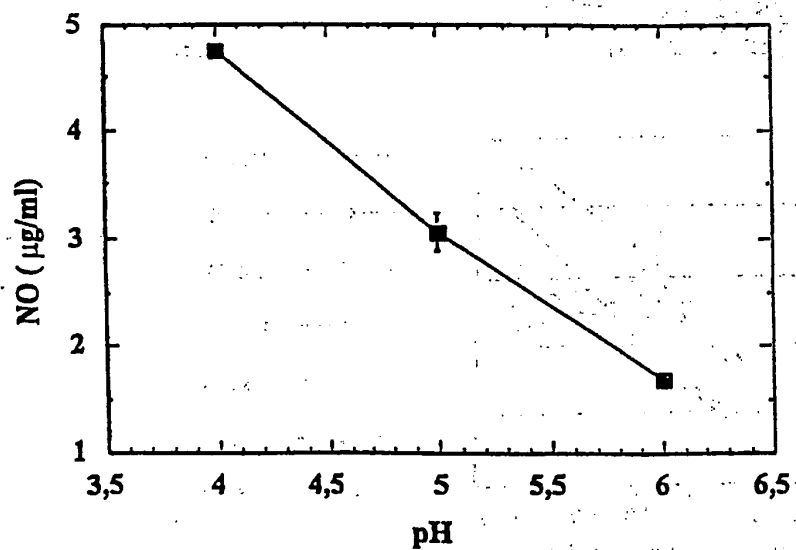


Figure 13

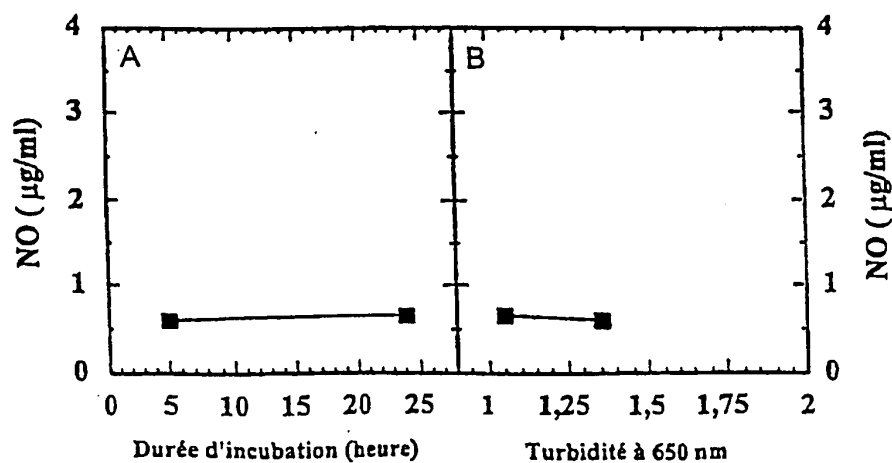


Figure 15

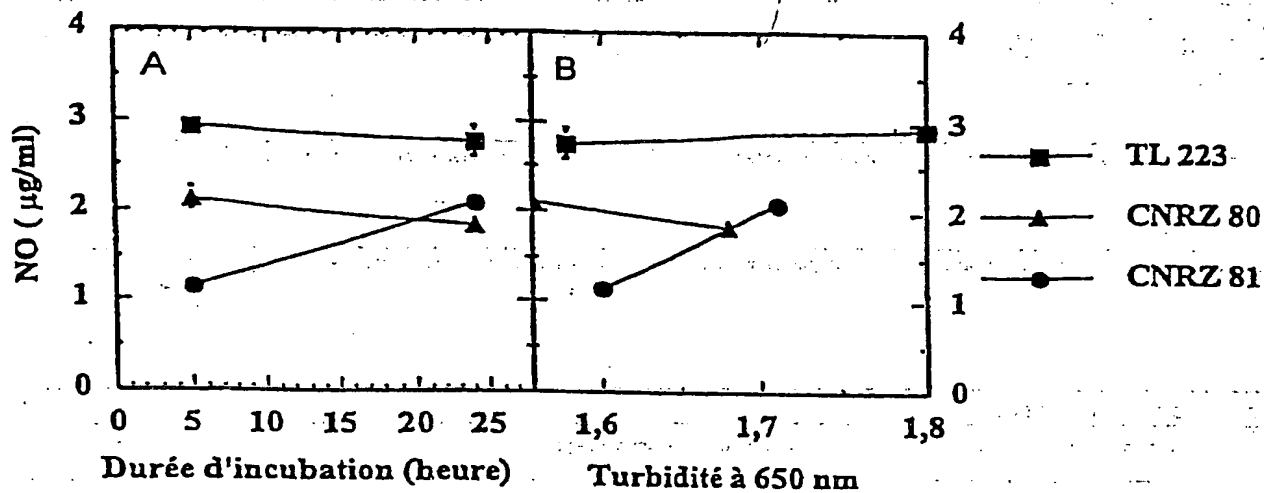


Figure 16

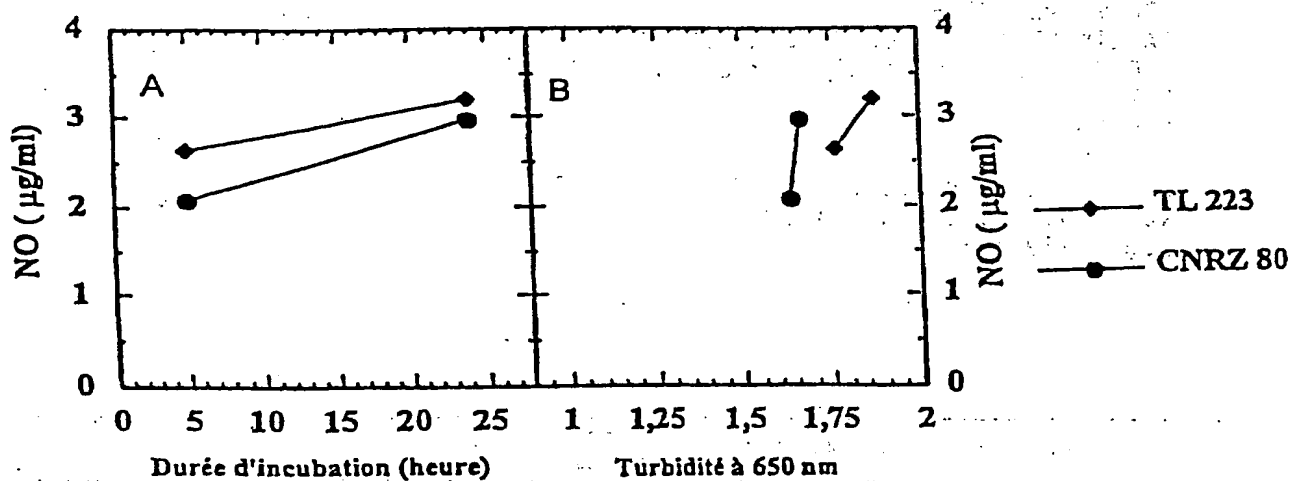


Figure 17

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 97/02399

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 A61K35/74 A23L1/03 A23L1/308 A23C19/032

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 A61K A23L A23C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 071 858 A (MILES LAB) 16 February 1983 see page 5, line 23 - page 6, line 22	
A	DATABASE MEDLINE FILE SERVER STN KARLSRUHE ABR G 93363965, PAWLIK ET AL: "MICROCIRCULATORY AND MOTOR EFFECTS OF ENDOGENOUS NITRIC OXIDE IN THE RAT GUT" XP002039361 see abstract & JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY, vol. 44, no. 2, June 1993, pages 139-146, --- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 May 1998

Date of mailing of the international search report

15/05/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, W

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 97/02399

C:(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE MEDLINE FILE SERVER STN KARLSRUHE ABR G 93146090, CALIGNANO ET AL: "INVOLVEMENT OF ENDOGENOUS NITRIC OXIDE IN THE REGULATION OF RAT INTESTINAL MOTILITY IN VIVO" XP002039362 see abstract &amp; EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 229, no. 2-3, 15 December 1992, pages 273-276,</p> <p>-----</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ER 97/02399

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0071858 A	16-02-1983	AU 8690782 A	10-02-1983
		DK 351682 A	07-02-1983
		JP 58036349 A	03-03-1983

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Internationale No  
PCT/FR 97/02399

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 A61K35/74 A23L1/03 A23L1/308 A23C19/032

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K A23L A23C

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 071 858 A (MILES LAB) 16 février 1983 voir page 5, ligne 23 - page 6, ligne 22	
A	<p>-----</p> <p>DATABASE MEDLINE FILE SERVER STN KARLSRUHE ABR G 93363965, PAWLIK ET AL: "MICROCIRCULATORY AND MOTOR EFFECTS OF ENDOGENOUS NITRIC OXIDE IN THE RAT GUT" XP002039361 voir abrégé &amp; JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY, vol. 44, no. 2, juin 1993, pages 139-146,</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

7 mai 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15/05/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Sitch, W

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dernière internationale No

PCT/FR 97/02399

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A.	<p>DATABASE MEDLINE  FILE SERVER STN KARLSRUHE  ABR G 93146090,  CALIGNANO ET AL: "INVOLVEMENT OF  ENDOGENOUS NITRIC OXIDE IN THE REGULATION  OF RAT INTESTINAL MOTILITY IN VIVO"  XP002039362  voir abrégé  &amp; EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY,  vol. 229, no. 2-3, 15 décembre 1992,  pages 273-276,</p> <p>-----</p>	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

### Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

a internationale No

PCT/FR 97/02399

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0071858 A	16-02-1983	AU 8690782 A	10-02-1983
		DK 351682 A	07-02-1983
		JP 58036349 A	03-03-1983